

トロンビン活性発現に重要なアミノ酸残基の検討

—異常プロトロンビンの生化学, 分子生物学的検討を用いて—

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

森 下 英 理 子

プロトロンビンは、血液凝固系において中心的な役割を果たすセリンプロテアーゼであるトロンビンの前駆体である。本研究では、先天性プロトロンビン異常症 (プロトロンビン Himi) の患者を対象として、精製プロトロンビンの酵素学的性質を検討し、さらにその遺伝子構造を解析し異常部位を同定することにより、トロンビン活性発現に重要なアミノ酸残基について検討した。発端者のプロトロンビン活性は正常の約 10% であったが、同抗原量は正常値であり、出血傾向は認めなかった。発端者の血漿から精製した異常プロトロンビンの酵素学的性質の検討を行い、以下の結果を得た。1) 異常プロトロンビンの Xa 因子による活性化様式は、正常プロトロンビンと同様であった。2) 異常プロトロンビンを活性化して得られた α -トロンビンは、フィブリノゲン凝固活性は低下していたが、合成ペプチド基質に対する水解能は正常と同じであった。以上の結果から、プロトロンビン Himi は α -トロンビン領域の基質結合部位に異常が存在することが予測された。次に構造異常を解析するために、プロトロンビン異常症の遺伝子解析を行った。発端者およびその家族の染色体 DNA より、 α -トロンビン領域をコードするエクソン 8 から 14 までの領域をポリメラーゼ連鎖反応にて増幅し、一本鎖核酸構造多形性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP) 法にて塩基配列の異常を検索した。その結果、エクソン 10 領域にこの家系に特異的な 2 種類の異常アレルが検出され、発端者はこの 2 種類の異常アレルを有しており、一つは父からもう一つは母から受け継がれていることが示された。そこで発端者の DNA を用いて、この異常な SSCP パターンを示したエクソン 10 領域の塩基配列を決定したところ、337 番目のメチオニン (methionine-337, Met-337) がスレオニン (threonine, Thr) (T→C) (変異 I) に、388 番目のアルギニン (arginine-388, Arg-388) がヒスチジン (histidine, His) (G→A) (変異 II) に置換していた。両親のプロトロンビン遺伝子の塩基配列を決定することにより、変異 I は父由来、変異 II は母由来であることが明らかとなり、発端者は 2 種類の異なる異常プロトロンビンを有する二重ヘテロ接合体であると考えられた。このように、トロンビン分子上の Met-337 と Arg-388 は、フィブリノゲンをフィブリンに変換する際に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

Key words prothrombin, thrombin, dysprothrombinemia, fibrinogen, thrombomodulin

プロトロンビンは、分子量約 72,000 で 579 残基からなる一本鎖糖蛋白質である¹⁾⁴⁾。プロトロンビンの活性化は、Xa 因子によりアルギニン (arginine, Arg)-271-スレオニン (threonine, Thr)-272 結合が水解され、フラグメント 1+2 とプレトロンビン 2 となる。プレトロンビン 2 には酵素活性はなく、Arg-320-イソロイシン (isoleucine, Ile)-321 結合が水解されて α -トロンビンとなる。

反応生成物の α -トロンビンはセリンプロテアーゼに属し、フィブリノゲンに作用してフィブリンを生成すると共に、凝固補酵素蛋白の第 V 因子や第 VIII 因子、および第 XIII 因子や血小板を活性化し、凝固促進的に作用する。しかし一方で、トロンビンはプロテイン C を中心とした凝固制御系を活性化し、積極的に凝固制御因子として機能している。つまり、トロンビンは血管内皮細胞膜に存在するトロンボモジュリンと結合することにより、抗凝固性セリンプロテアーゼ前駆体のプロテイン

C が選択的に活性化され、さらにトロンビンの向凝固作用 (フィブリノゲン凝固、第 V 因子、第 VIII 因子、第 XIII 因子活性化、血小板活性化など) が阻害される。このようにトロンビンは、凝固促進作用と凝固阻止作用という相反する作用を両方有することが知られている。

しかし、トロンビン分子上のフィブリノゲンやトロンボモジュリンなどの種々の基質との結合部位に関する詳細は不明な点が多く、トロンビン活性の発現機序に関する研究は現在も多くなされている。いくつかの試験管内反応系における研究の報告によると、アニオン結合部位と呼ばれる活性中心周辺の陽性に荷電している表面残基の領域が、多くの基質、補因子、インヒビターとの結合部位であると考えられている。 α -トロンビンから β -トロンビンに変換する際に切断される Arg-393 もアニオン結合部位に位置しており、 β -トロンビンは合成基質を分解するもののフィブリノゲンをフィブリンに変換せず、プロテ

平成 5 年 6 月 2 日受付, 平成 5 年 7 月 9 日受理

Abbreviations: Arg, arginine; APTT, activated partial thromboplastin; Cys, cysteine; dCTP, deoxycytidine triphosphate; dNTP, deoxynucleoside triphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; His, histidine; Met, methionine; Ile, isoleucine; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline;

ンCの活性化も低下することから、アニオン結合部位はフィブリノゲンやトロンボモジュリンとの結合に重要な領域であると考えられている。また、現在までにいくつかの異常トロンビンの構造解析と酵素学的性質との検討により、トロンビン分子の基質結合に重要な役割を果たしているアミノ酸残基が決定されている。このように試験管内反応系での研究結果のみでなく、異常トロンビンを有する臨床例を用いて、その異常分子の構造および機能を検討することにより、トロンビン活性の発現に重要な部位を明らかにすることができる。

本研究では、最近偶然発見された出血傾向を認めない先天性プロトロンビン異常症の患者を対象として、精製異常プロトロンビンの酵素学的性質を検討し、さらにその遺伝子構造を解析し異常部位を同定することにより、トロンビンの凝固促進あるいは凝固阻止作用の活性発現に重要なアミノ酸残基について検討した。

対象および方法

I. 対象

対象は、先天性プロトロンビン異常症の一家系（発端者およびその両親、二人の妹）である。発端者は富山県氷見市出身の26歳女性で、出血傾向の既往歴はない。妊娠時の凝血的検査にて、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の延長を認めたため、精査目的にて当院内科を受診した。尚、2回目の出産では帝王切開を施行するも異常出血の合併は認めなかった。両親は血族結婚ではなく、家系内に異常出血者は認めない（図1）。身体所見、一般血液学的検査成績については、特記すべきことはない。

II. 方法

1. 血液凝固パラメータの測定

採血は3.8% クエン酸ナトリウム 0.5ml 入り真空採血管に4.5mlの血液を採取し、速やかに4°C, 3000rpm, 10分間遠心分離して血漿を得た。各測定項目のうち、プロトロンビン時間（prothrombin time, PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin, APTT）、フィブリノゲン濃度、各種凝固因子活性は採血後ただちに測定し、残りの血漿は-80°Cにて凍結保存し、随時融解して使用した。PTはシンプラスチン（Organon Teknika, Turnhout, Belgium）を試薬とし³⁾、またAPTTはプラテリン・プラス・アクチベータ（Organon Teknika）を試薬とし⁴⁾Quick一段法により、自動測定装置（Auto-Fi, Dade, Miami, USA）を用いて測定した。フィブリノゲンはトロンビン時間法⁵⁾による測定キットであるデータファイ・フィブリノゲン（Baxter, Miami, U.S.A）を用いて、自動測定装置にて測定した。第V, VII, VIII, IX, X, XI, XII凝固因子活性は、それぞれの因子欠乏血漿（Baxter）を用いて一段法により測定した。第XIII凝固因子抗原量は、コアソルF XIII（メディカルリンク、神奈川）を用いて測定した。

2. 血漿中プロトロンビン活性および抗原量の測定

凝固系におけるプロトロンビン活性化因子は、Xa因子、Ca²⁺イオン、リン脂質およびVa因子の複合体（プロトロンビナーゼ複合体）であるが、プロトロンビン活性の測定法には通常外因系の組織トロンボプラスチンによる一段法が用いられ

る。特殊なプロトロンビン活性の測定法として、*Echis carinatus*⁶⁾やTaipan蛇などの蛇毒酵素や、スタフィロコグラゼ⁹⁾¹⁰⁾をプロトロンビン活性化因子として用いる場合がある。*Echis carinatus*蛇毒中に存在するプロトロンビン活性化酵素は、Ca²⁺イオンやリン脂質、Va因子を要求せず、プロトロンビン分子内のペプチド結合を特異的に水解することにより、 α -トロンビンへと活性化する¹¹⁾。*Staphylococcus aureus*の菌体外蛋白質であるスタフィロコグラゼは、プロトロンビンと1:1の分子複合体を形成することによってプロトロンビンを活性化するが、この際他の因子は必要でなく、また分子内のペプチド結合も全く水解されない。今回は、通常の一段法と、特殊な測定法として*Echis carinatus*蛇毒（Sigma, St. Louis, USA）、スタフィロコグラゼ（九州大学理学部、岩永貞昭教授より供与）を用いた方法を行った。

プロトロンビン抗原量はLaurell¹²⁾、すなわち抗ヒトプロトロンビン抗血清（Behringwerke AG, Marburg, Germany）を含むアガロースゲル平板中で被検血漿を電気泳動させ、沈降反応によって生ずるロケット状の沈降帯の高さを抗原量として測定した。

3. プロトロンビン抗原の定性と易動度の検討

抗原の定性についてはオクタロニー法¹³⁾を用いて、被検血漿と健常血漿の沈降線を比較した。抗ヒトプロトロンビン抗血清を用いてアガロースゲルで被検血漿と健常血漿の二次元免疫電気泳動¹⁴⁾を行い、易動度を比較した。

4. 精製プロトロンビンおよびトロンビンの性状についての検討

1) プロトロンビンおよびトロンビンの精製

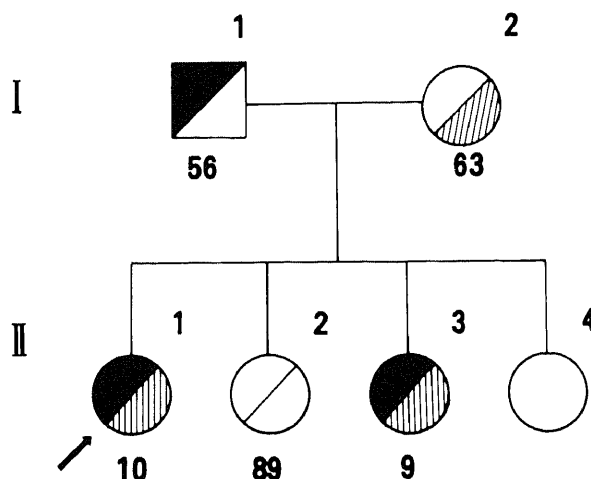


Fig. 1. Pedigree of the family with prothrombin Hemi. Proband is indicated by an arrow. The numbers below the symbols denote prothrombin clotting activities (one-stage assay method) as a percentage of normal activity. Inheritance of the variant proteins was followed on the basis of the PCR-SSCP analysis. \square , Heterozygote for the type I mutation (I/-); \odot , heterozygote for the type II mutation (II/-); \bullet , compound heterozygote for the type I and II mutations (I/II); \circ , normal; \square , not tested.

プロトロンビンは Morrison および Esnouf の方法¹⁵⁾に準じて精製した。すなわち、100ml のクエン酸加血漿を塩化バリウムで吸着しモノ Q (Pharmacia, Uppsala, Sweden) カラムクロマトグラフィーで溶出した。精製 α -プロトロンビンは、Kawabata らの方法¹⁶⁾により精製プロトロンビンを *Echis carinatus* 蛇毒を用いて活性化し、CM-セファロース (Pharmacia) カラムクロマトグラフィーにて溶出した。得られた精製プロトロンビンと α -プロトロンビンは、Laemmli の方法¹⁷⁾によってドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) を行った。

2) 精製プロトロンビン活性化による生成 α -プロトロンビン活性の検討

0.1M CaCl_2 を含む 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) (Tris-buffered saline, TBS) 中の精製プロトロンビンに、活性化因子としてウシ Xa 因子 (Enzyme Research Laboratories, South Bend, USA) あるいは *Echis carinatus* 蛇毒を加えて、37℃90分間加温した。経時的に反応混合液 50 μ l を分取し、SDS-PAGE を行い、プロトロンビンの限定分解パターンをみた。さらに同時に、生成プロトロンビンのフィブリノゲン凝固活性および合成基質 S-2238 (Kabi Diagnostica, Stockholm, Sweden) を用いた合成基質水解活性を測定した。

5. DNA 解析

1) 末梢白血球からの DNA 抽出

高分子 DNA は、Kunkel らの方法¹⁸⁾を一部改変し、以下のようにして抽出した。エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) のはいった採血管で 10ml 採血し、NaCl で等張にしたデキストラン溶液を 1/3 量加えて 1 時間放置した。上層を遠心して得た沈殿を磷酸緩衝食塩水 (pH7.2) (phosphate-buffered saline, PBS) (10mM 磷酸緩衝液, 0.14M NaCl) で 2 回洗浄した後、5 倍量の細胞分解溶液 (0.32M スクロース, 1% トリトン-X, 5mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl (pH7.5)) に懸濁した。遠心後、沈殿した核分画に生理食塩水-EDTA 液を 5ml, 10%SDS を 0.5ml 加え攪拌後、プロテイナーゼ K 溶液 (10mg/ml) (Merck, Darmstadt, Germany) を 55 μ l 加え、37℃4時間保温した。等量のフェノールを混和し遠心後水層を回収した。同様の操作をフェノール・クロロホルム (1:1) 液、クロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) で繰

り返した。得られた水層をエタノール沈殿させ、沈殿した DNA を 200~500 μ l の TE 溶液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH8.0)) に溶解し、4℃ に保存し使用した。

2) プライマー作成

Davie らの報告¹⁹⁾によると、プロトロンビンの DNA の長さは 21Kbp で 14 のエクソンを含んでおり、 α -プロトロンビン領域はエクソン 8 からエクソン 14 までに含まれている。今回の DNA 解析は α -プロトロンビン領域に範囲を絞ったので、エクソン 8 からエクソン 14 までのすべてのエクソン配列とスプライシング部位を解読できるように、Davie らが報告したプロトロンビン遺伝子のイントロン配列から計 5 対のプライマーを作成した。すべてのプライマーは、スプライス部位から約 50 塩基上流または下流に設定した。それぞれのプライマーの配列は、表 1 に示した。

3) ポリメラーゼ連鎖反応法 (polymerase chain reaction, PCR)

高分子 DNA 1 μ g を鋳型 DNA として、200 μ M のプライマー 1 組、デオキシヌクレオシド三磷酸 (deoxynucleoside triphosphate, dNTP) 各 200 μ M, Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 2.5 単位を、10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 1mM MgCl_2 , および 0.01% ゼラチンの緩衝液に加え²⁰⁾、滅菌蒸留水により全量 100 μ l に調整した。加熱による反応液の蒸発を防ぐため、50 μ l のミネラルオイル (Sigma) を重層した。反応は DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) を用い、熱変性、アニーリング、プライマー伸張の条件はそれぞれ表 1 に示したように設定し、これを 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返した。反応終了後、上層のミネラルオイルを除去し、増幅した DNA 断片をクロロホルムで抽出した。

4) 一本鎖核酸構造多形性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP) 法

SSCP 法は、すでに塩基配列の知られている特定の遺伝子の構造異常を検索する際に有効な解析法である。原理は以下のようである。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ デオキシシチジン三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP) を直接 PCR 反応液に入れて増幅 DNA 断片を ^{32}P で標識し、加熱変性させた後中性のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動する。変性して一本鎖となった DNA 断片は、その塩基配列に特異的な高次構造を取るため、

Table 1. Oligonucleotides and conditions used to amplify the human prothrombin gene

Exon	Oligonucleotides	Denaturation	Annealing	Extension
8~9	5' TGCCTGGGTCCCAACAGAGGA 3'	94℃	65℃	72℃
	5' AATGGTAGCGCAGGGCTCCAGGA 3'	60 s	120 s	180 s
10	5' TACGAATTCTCATCCTCAGCTCCTAATGC 3'	94℃	60℃	72℃
	5' AGACACCCACGGGCCACCAAGTT 3'	60 s	120 s	180 s
11	5' TTCTCCATTTCTTTCTTGGGGT 3'	94℃	60℃	72℃
	5' TCAGCTAACAAGCATCTGGTGGC 3'	60 s	120 s	180 s
12	5' TCTCACTAGGCCCTTCTTCCTTC 3'	94℃	60℃	72℃
	5' ATCGGATCCTTGAACCCAGGCACAACCTCA 3'	60 s	120 s	180 s
13~14	5' CTTGAATTCTCACCAGCTGTGTCTCGTGA 3'	94℃	60℃	72℃
	5' TTTGGATCCTGGGAGCATTGAGGCTCGCT 3'	60 s	120 s	180 s

相補的な二本の断片はそれぞれ電気泳動上異なる移動度を示す。ここで DNA 断片内に塩基置換や短い塩基の挿入、欠失などの構造変化が存在する場合は、その一本鎖 DNA の高次構造が変化するため、構造変化のない断片とは異なる位置に電気泳動される。従って断片の移動度の差として、この塩基配列上の変化を検出することができる。

PCR-SSCP は、Orita らの方法²¹⁾²²⁾に従った。PCR は、高分子 DNA 50ng, dNTP 各 30 μ M, 1 μ M のプライマー 1 組, Taq DNA ポリメラーゼ 0.25 単位, [α -³²P] dCTP (111TBq/mmol, 370MBq/ml) (Amersham, Buckinghamshire, UK) 0.2 μ l に前述した PCR 緩衝液を加え全量 5 μ l として行った。増幅した放射性標識 DNA 断片を、ホルムアミド色素溶液 (95% ホルムアミド, 20mM EDTA, 0.05% プロモフェノールブルー, 0.05% キシレンシアノール) にて10倍に希釈し、90℃ 3 分加熱変性させた後、90mM Tris- ホウ酸 pH8.3, 2.5mM EDTA および 5% グリセロールを含む 5% ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド/N, N'-メチレンビスアクリルアミド, 49:1) にのせ、定電力、40W で約 3~5 時間電気泳動した。このとき、ゲル板を送風機によって空冷した。泳動後ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィを行った。

5) シークエンス反応

一対のプライマーのうち 5' 末端側のプライマーを、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (ニッポンジーン, 富山) を用いて、10mM ATP 存在下でリン酸化し、PCR に用いた。PCR で増幅して得られた DNA 断片は、0.8% 低融点アガロースゲル (アガロース L, ニッポンジーン) に泳動後、目的とする DNA 断片を切り出し、サブクローニングに用いた。ライゲーションは、Sma I 切断し脱リン酸化した pUC19 プラスミドに目的の DNA 断片を加え、T4 DNA リガーゼ (ニッポンジーン) を用いて 10mM APT 存在下で、16℃ 一晩反応させた。大腸菌は、コンピテント化した大腸菌 JM109 (ニッポンジーン) を使用した。T7 DNA ポリメラーゼ (Sequenase Ver.2.0, United State Biochemical Corporation, Ohio, USA) を用いてダイデオキシ法²³⁾でシークエンスを行った。シークエンスゲルは、8.5M 尿素, 7% のポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド/N, N'-メチレンビスアクリルアミド, 19:1) を使用した。

成 績

I. 先天性プロトロンビン異常症の凝血学的所見

発端者の出血時間、血小板数はともに正常、PT 17.5 秒 (正常値 11.9~13.9), APTT 71.4 秒 (正常値 45秒以下) とともに延長を認めた。プロトロンビン活性が 10% と著明な低下を認める

Table 2. Prothrombin level as determined by various methods

Family member (pedigree position)	Plasma prothrombin level (% normal)			
	One-stage assay	<i>Echis carinatus</i> assay	Staphylocoagulase assay	Immunological assay
Proband (II-1)	10	<10	65	88
Father (I-1)	56	57	78	92
Mother (I-2)	63	60	78	88
Sister (II-2)	89	88	84	92
Sister (II-3)	9	<10	52	76

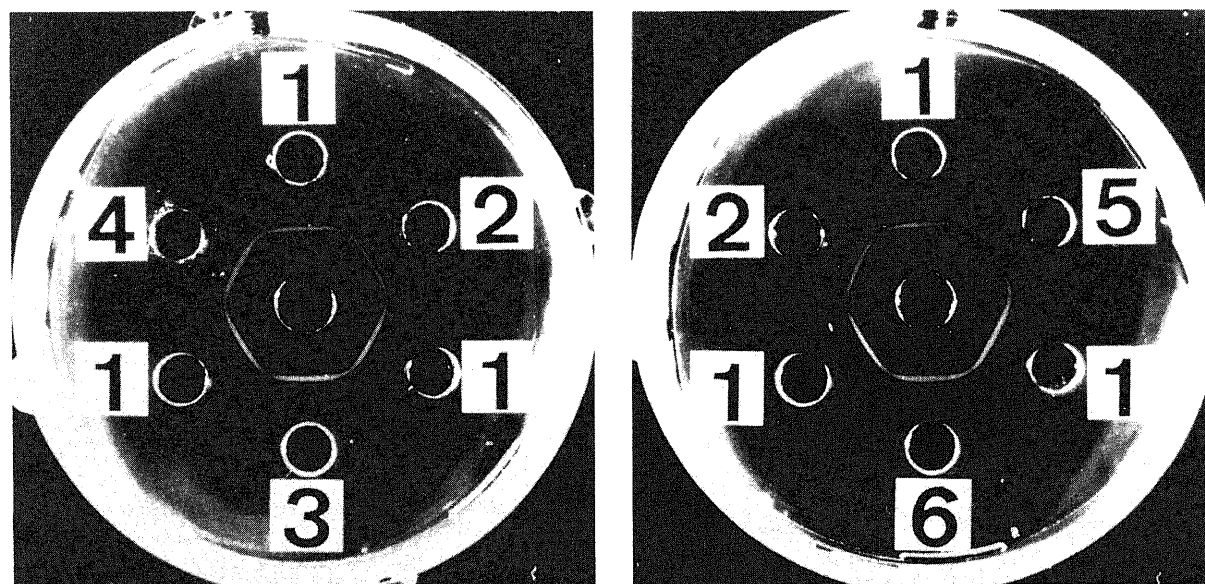


Fig. 2. Immunodiffusion (Ouchterlony) of plasma against antiprothrombin antibodies. Central well, antiprothrombin antibodies; 1, normal plasma; 2, proband's plasma; 3, father's plasma; 4, mother's plasma; 5, sister's (II-2 in Fig. 1) plasma; 6, sister's (II-3) plasma. Line of identity between normal and abnormal prothrombin clearly seen among all plasmas investigated.

以外、他の凝固因子活性は全て正常であった。循環抗凝血素は認められなかった。

表2に発端者とその家族の血漿を用いた場合の、種々の測定法によるプロトロンビン活性および抗原量の測定結果を示す。通常の一段法によるプロトロンビン活性は、発端者、妹（家系

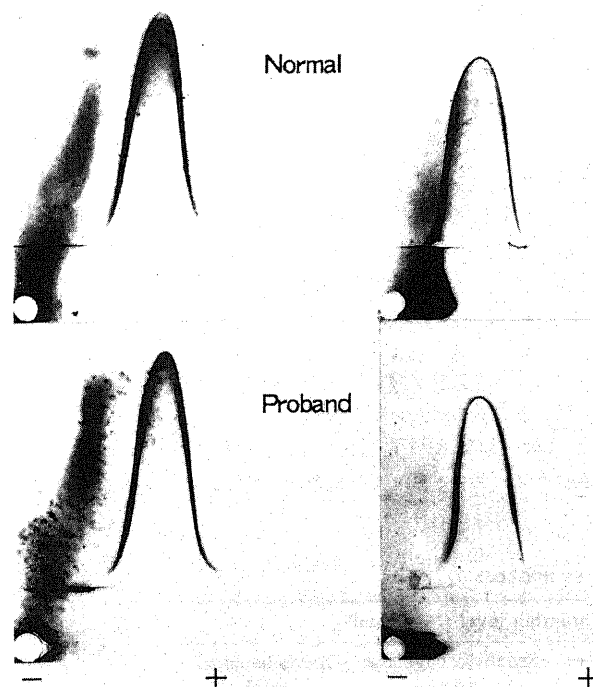


Fig.3. Closed immunoelectrophoresis of plasma against antiprothrombin antibodies. Plasma samples were run in the absence (left) or presence of calcium ions (right) in the first dimension. No difference in mobility was noted between normal and patient's plasma. The addition of calcium ions to the buffer did not change the pattern.

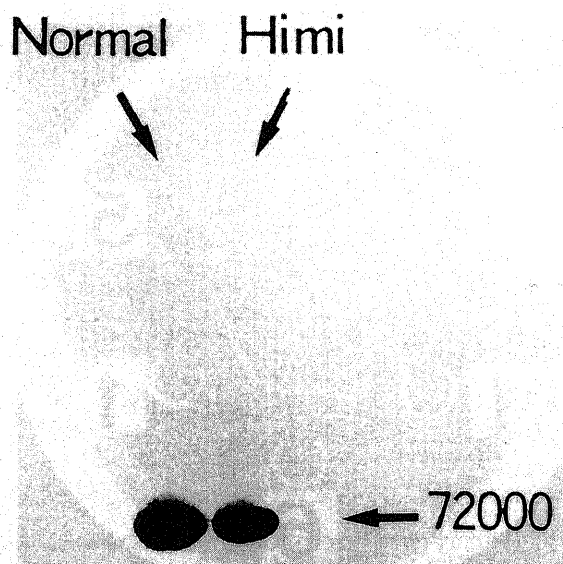


Fig.4. Analysis of purified prothrombins by SDS-PAGE. Normal prothrombin and prothrombin Himi migrated as a single band with the same mobility of SDS-PAGE, and their molecular weights were estimated as 72,000.

図位置: II-3)において正常血漿の約10%, 父および母では約50%であった。Echis carinatus 蛇毒活性化酵素を用いて活性化した α -トロンビン活性は、発端者および妹(II-3)で10%以下、両親が約60%であったが、スタフィロコアグラエの場合は、発端者および妹(II-3)で正常の約50%, 両親では正常とほぼ同様の活性を示した。一方、同抗原量は全員正常血漿と同様であった。以上より、本家系を先天性プロトロンビン異常症と診断し、プロトロンビン Himi と命名した。

プロトロンビン抗原の定性では、抗ヒトプロトロンビン血清に対して、健康血漿、発端者およびその家系員の血漿は、それぞれ1本の沈降線を作り互いに融合した(図2)。つまり発端者の血漿は、両親、健康者との間に抗原性の差異を認めなかった。

血漿を用いた交差免疫電気泳動では、発端者と健康対照との間に易動度の差異は認めなかった(図3, 左)。さらに Ca^{2+} イオンを加えた泳動緩衝液にて易動度を検討したが、両者に差異は認められず(図3, 右)、異常プロトロンビン分子のGla領域での Ca^{2+} イオンとの結合は正常と考えられた。

II. 精製異常プロトロンビンの性状

異常プロトロンビンのモノQカラムクロマトグラフィーによる溶出パターンは、単一峰として正常とほぼ同じイオン強度で溶出された(データは示さず)。精製異常プロトロンビンは、SDS-PAGEで正常と同一分子量(72,000)で、単一バンドを示

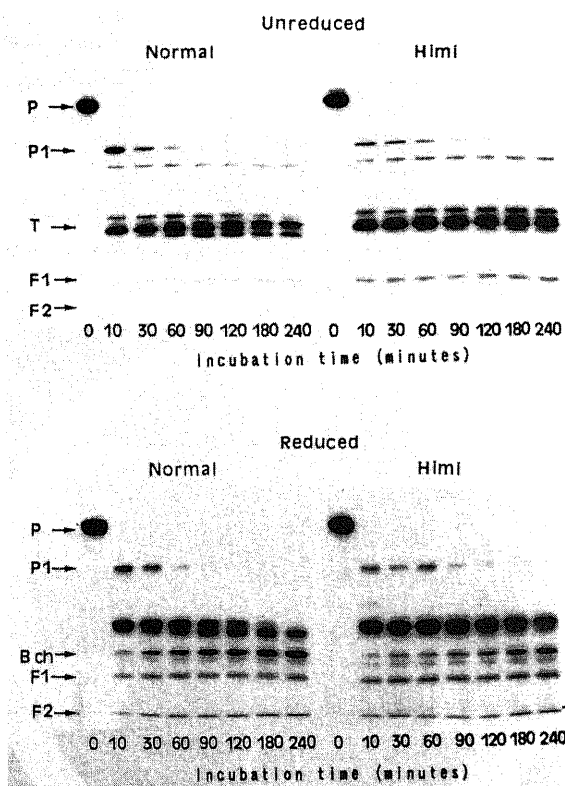


Fig.5. Cleavage pattern of normal prothrombin and prothrombin Himi by bovine factor Xa (6 U/mg prothrombin) in the presence of Ca^{2+} (5 mM) and phospholipids. The products of proteolysis have been analyzed by SDS-PAGE. P, prothrombin; P1, prethrombin 1; T, α -thrombin; F1, fragment 1; F2, fragment 2; B ch, B chain.

した (図4)。

図5は精製した正常および異常プロトロンビンを、リン脂質, Ca^{2+} イオン存在下でウシ Xa 因子により活性化し、その限定分解パターンを SDS-PAGE で調べたものである。異常プロトロンビンは、正常と同一分子量のフラグメント1, フラグメント2および α -トロンビンを生成し (上段), 還元条件下でも同一分子量のB鎖が検出された (下段)。精製プロトロンビンを *Echis carinatus* 蛇毒で活性化した場合も, Xa 因子で活性化した場合と同様の結果を得た (データは示さず)。図6は, *Echis carinatus* 蛇毒により正常および異常プロトロンビンを活性化した際の, 生成 α -トロンビン活性の経時的变化を示したものである。上段が生成 α -トロンビンのフィブリノゲン凝固活性を示したものであるが, プラトーに達した時点で両者を比較すると, 異常プロトロンビンでは正常の約37%の活性しか示さない。一方下段は, 生成 α -トロンビンの合成基質 S-2238 を用いた水解活性を示したものであるが, 両者はほぼ同じ活性を示した。このことより, 異常プロトロンビンは低分子量の合成基質は分解するが, フィブリノゲンをフィブリンに変換する能力が低下していると考えられる。

これらの成績から, 異常プロトロンビンは Xa 因子による水解部位は正常であり, α -トロンビン領域の基質結合部位に異常の存在することが推定された。

Ⅲ. 精製異常トロンビンの性状

Echis carinatus 蛇毒で活性化された異常トロンビンは, CM-セファロースカラムで単一峰として正常トロンビンとはほぼ同じイオン強度で溶出された。また SDS-PAGE で検討したところ非還元, 還元ともに分子量において正常と差がみられな

かった (図7)。

Ⅳ. 異常トロンビンの遺伝子解析

1. PCR-SSCP 法

健常者4人, 発端者およびその両親と2人の妹の末梢白血球より高分子 DNA を抽出し, プロトロンビン遺伝子の中のトロンビン領域をコードするエクソン8からエクソン14までの領域を5つに分け, PCR 法にて増幅した。増幅した5つの領域の DNA 断片は全て単一バンドで目的とするサイズが得られ, 健常者, 発端者およびその家系員との間に差異は認めなかった

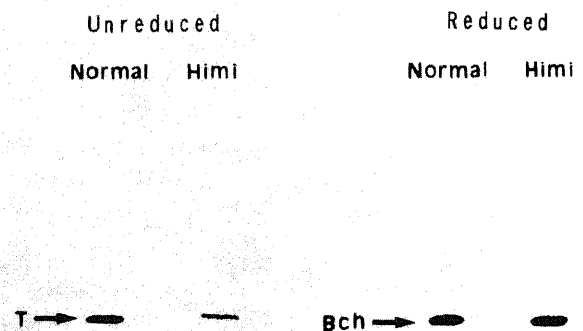


Fig.7. Analysis of purified thrombins by SDS-PAGE. T, α -thrombin; B ch, Bchain. The molecular weight of the reduced and unreduced forms of thrombin Himi appeared indistinguishable from that of normal α -thrombin.

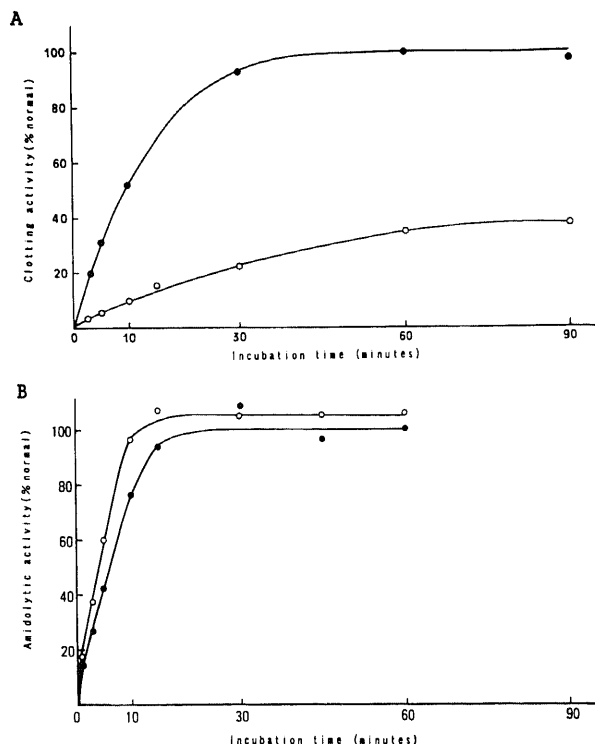


Fig.6. Production of clotting (A) and amidolytic (B) activities upon activation of normal prothrombin and prothrombin Himi by *Echis carinatus* venom. ●, normal prothrombin; ○, prothrombin Himi.

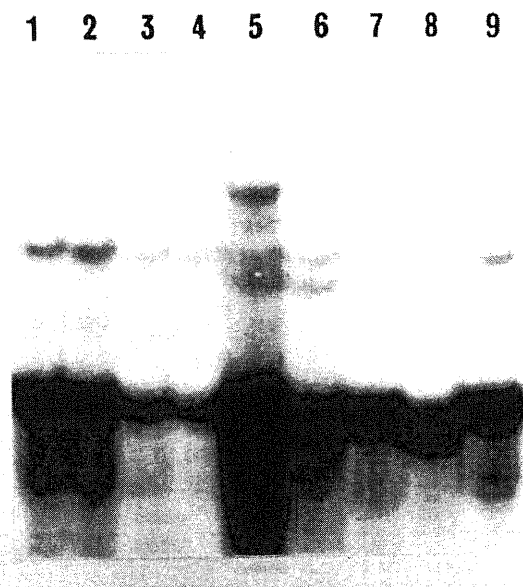


Fig.8. PCR-SSCP analysis of exon 10 in the prothrombin gene. Genomic DNA from leukocytes of normal controls (lanes 1 through 4) and family members (lanes 5 through 9) was subjected to PCR-SSCP analysis using a pair of primers flanking exon 10 of the prothrombin gene. Lane 5, proband (II-1 in Fig.1); lane 6, father (I-1); lane 7, mother (I-2); lane 8, sister II-3; lane 9, sister II-2.

(データは示さず).

PCR-SSCP 法では対立配列について2本の単鎖DNAを生じるので, ホモ接合体では2本, ヘテロ接合体では4本のバンドが観察される. PCR にて増幅した DNA 断片を SSCP 法にて解析したところ, エクソン10領域にて発端者, プロトロンビン活性低下の妹(Ⅱ-3)および両親の移動度の異常を認めた(図

8). 健常者4人(第1~4列)は2本のバンドを示したが, 父(第6列)と母(第7列)は4本のバンドを認め, 4本のうち2本は健常者のバンドと一致していたことより, 父と母は正常と異常のアレルを有するヘテロ接合体であると考えられた. しかも, 父と母の異常アレルのバンドは移動度が異なっていた. 発端者(第5列)とプロトロンビン活性低下の妹(第8列)は, 父

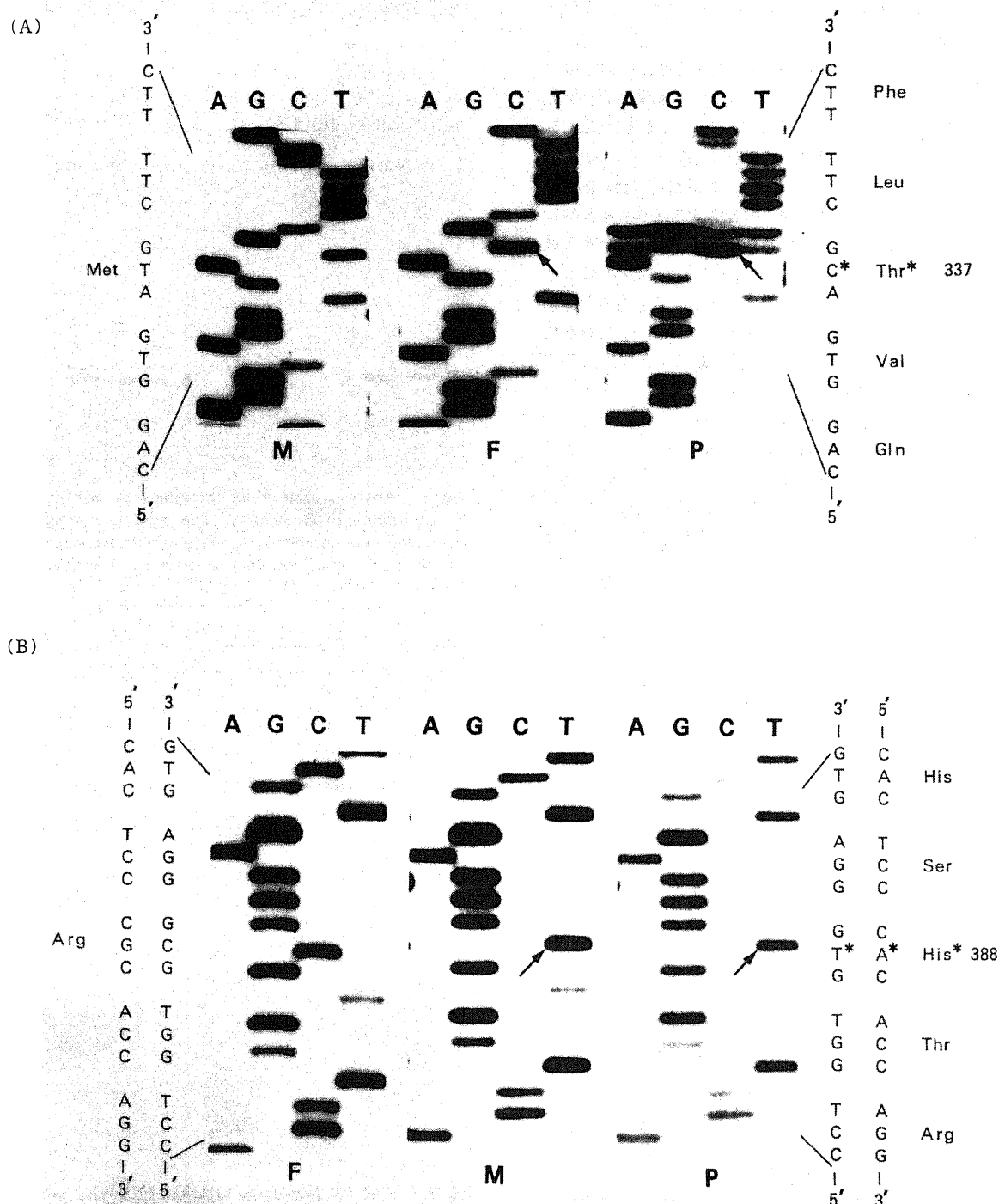


Fig. 9. Nucleotide sequences of exon 10 of the prothrombin gene from the proband and her parents. (A) A single nucleotide substitution, a T to C transition (*), changes the code from methionine (Met) to threonine (Thr) at amino acid position 337. (B) A single nucleotide substitution, a G to A transition (*), changes the code from arginine (Arg) to histidine (His) at position 388. Arrows indicate the nucleotide substitution. P, proband; F, father; M, mother. Phe, phenylalanine; Leu, leucine; Val, valine; Gln, glutamine; Ser, serine.

と母の異常アレルのバンドを両方有していた (図 8)。一方プロトロンビン活性が正常であった妹 (II-2) (第 9 列) は、健常者と同一の SSCP パターンを示した。発端者およびその両親、妹 (II-3) において、エクソン 10 領域以外には、異常アレルの存在は認めなかった (データは示さず)。これらの成績より、発端者は 2 種類の異常プロトロンビンの原因となる変異遺伝子を有する複合ヘテロ接合体であり、その変異部位は 2 ヶ所ともエクソン 10 領域に存在することが予測された。

2. シークエンス

以上の SSCP 法の結果をふまえ、次に異常な SSCP パターンを示した発端者のエクソン 10 領域およびスプライシング部位をサブクローニングし、その塩基配列を決定した。PCR 中での合成反応の誤りを除外するために、複数の PCR 反応に由来した DNA 断片から、6 個のクローンを得て塩基配列決定に用いた。その結果、6 個のうち 3 個のクローンで、メチオニン (methionine, Met)-337 に相当するコドン GTA が、Thr のコドンである GCA にアミノ酸置換しており (変異 I) (図 9, A)、他の 3 個のクローンでは Arg-388 に相当するコドン CGC が、ヒスチジン (histidine, His) のコドンである CAC に置換していた (変異 II) (図 9, B)。

これら 2 ヶ所の変異が、両親から由来したものであることを確認するために、両親のエクソン 10 領域をそれぞれサブクローニングし、塩基配列を決定した。父の場合、5 個のクローンのうち 3 個で 337 番目のコドンである GTA が GCA に置換しており、他の 2 個は正常者と同様の配列であった。一方の母の場合は、5 個のクローンのうち 2 個で 388 番目のコドンである CGC が CAC に置換しており、他の 3 個は正常な配列であった。これらの結果より、発端者で認められた変異 I は父由来、変異 II は母由来であることが明らかとなった。さらに、発端者のエクソン 10 領域以外のエクソン 8 からエクソン 14 およびスプライシング部位の塩基配列を全て決定し、前述の 2 ヶ所の点変異以外には遺伝子変異を認めないことを確認した。

考 察

プロトロンビンは典型的なセリンプロテアーゼ前駆体であり、活性化されて α -トロンビンとなる。反応生成物の α -トロンビンは、血小板を活性化したり、フィブリノゲンに作用してフィブリンを生成する。また、第 V 因子や第 VIII 因子を活性化して血液凝固カスケード反応を速めたり、また第 XIII 因子を活性化する作用もあり、凝固促進作用を有する。しかし一方で、血管内皮細胞膜に存在するトロンボモジュリンと結合することにより、凝固阻害因子であるプロテイン C の特異的活性化

因子に変化し、トロンビンの向凝固作用も阻害される。このようにトロンビンは、凝固促進活性と凝固阻止活性の両方を有しているが、その活性発現の機序に関しては不明な点が残されており、現在も多くの研究がなされている。

プロトロンビン異常症は世界で 20 家系ほど報告されており、日本では本症例も含めて 3 家系、プロトロンビン Tokushima²⁴、Obihiro²⁵、Himi が発見されている。一般にプロトロンビン異常症は出血傾向を呈し、外傷後や外科手術では止血しにくいといわれる。しかし、プロトロンビン Salakta²⁴ と本症例の Himi は無症状で出血の既往もみられず、プロトロンビンの構造およびその機能を検討するうえで非常に興味深い症例といえる。

プロトロンビンの活性化因子としては、プロトロンビナーゼ複合体のほか、各種の蛇毒酵素、*Staphylococcus aureus* の菌体外蛋白質であるスタフィロコアグラゼなどがあり、それぞれ異なった経路によりプロトロンビンを活性化する。プロトロンビナーゼ複合体は、Xa 因子および Ca^{2+} イオン、リン脂質、Va 因子により構成され、Xa 因子はプロトロンビン分子内の Arg-271-Thr-272 と Arg-320-Ile-321 のペプチド結合を水解することにより (図 10 の ①, ②)、 α -トロンビンへと活性化する。一方、*Echis carinatus* 蛇毒中に存在するプロトロンビン活性化酵素は、 Ca^{2+} イオンやリン脂質、Va 因子を要求せず、プロトロンビン分子の Arg-320-Ile-321 の部位 (図 10 の ①) を特異的に水解することにより活性化する。また、スタフィロコアグラゼはプロトロンビンと 1:1 の分子複合体を形成することにより活性化されるが、この際他の因子は必要でなく、また分子内のペプチド結合もまったく水解されない。したがって、スタフィロコアグラゼで異常プロトロンビンを活性化させ、その活性が正常と同程度であった場合は、 α -トロンビン領域は正常であると考えられ、一方正常より低下している場合は、 α -トロンビン領域内での構造異常が考えられる。このように活性化因子を使い分けることにより、患者血漿を用いてプロトロンビン中のどこに異常があるかをある程度予測することができる。しかし、こうした血漿を用いた実験には細心の注意が必要で、プロトロンビン Metz²⁷ と Molise²⁸ の場合、血漿をスタフィロコアグラゼで活性化させると正常と同様の活性を示すものの、精製プロトロンビンを用いた実験では、 α -トロンビン領域内に構造異常が見いだされた。本症例も、血漿をスタフィロコアグラゼで活性化すると発端者では正常の約 50%、両親ではほぼ正常と同様の活性を示したが、精製プロトロンビンを用いて詳細に検討すると α -トロンビン領域内に異常が存在することが明らかとなった。

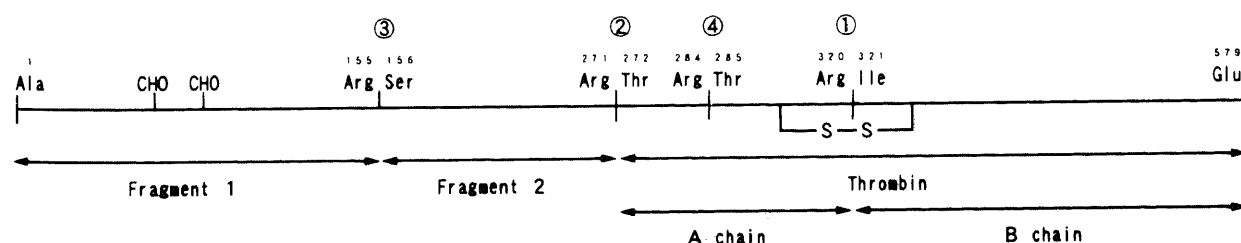


Fig. 10. Polypeptide chain structure and cleavage sites of human prothrombin. The residue numbering corresponds to the sequence for human prothrombin by Degan *et al.* The carbohydrate (CHO) attachment and disulfide bridge (-S-S-) are shown. The factor Xa-activation cleavage sites (① & ②) and thrombin-postactivation cleavage sites (③ & ④) are also indicated.

精製異常プロトロンビンを用いてプロトロンビン内の異常部位をより詳しく検討した結果、異常プロトロンビンは1) Xa因子による活性化部位の異常、2) Ca^{2+} イオン結合部位の異常、3) トロンビン領域の異常、の3つに分類される。

プロトロンビン Barcelona²⁹⁾, Madrid³⁰⁾, Clamart³¹⁾ が、Xa 因子による活性化部位の異常と推定されており、このうちプロトロンビン Barcelona と Madrid は271番目の Arg がシステイン (cysteine, Cys) に置換していた²⁹⁾³⁰⁾。 Ca^{2+} イオン結合部位の異常としては、プロトロンビン San Juan³²⁾ が考えられているが、構造異常については不明である。プロトロンビン Himi のようにトロンビン領域の異常としては、現在までに本異常トロンビンも含めて7つの異常トロンビンのアミノ酸置換が同定されている。

プロトロンビン Tokushima では、418番目の Arg がトリプシンに置換したため³³⁾ 基質結合部位の荷電状態あるいは立体構造が変化し、その結果基質結合能が低下したと考えられる。プロトロンビン Quick³⁴⁾ は二重ヘテロ接合体で、アミノ酸置換部位は両方共トロンビン領域内に存在しており、トロンビン Quick I, Quick II と命名されている。トロンビン Quick I は、382番目の Arg が Cys に置換しており³⁵⁾、同部位はアニオン結合部位を形成する残基の一つであることが明らかになっている。トロンビン Quick II は558番目のグリシンがバリンに置換しており³⁶⁾、同部位は基質結合ポケットの一部を担っているもので、その異常のためにフィブリノゲン凝固活性だけでなく合成基質水解活性も消失すると考えられる。プロトロンビン Salakta では466番目のグルタミンのアラニンへの置換により³⁷⁾、基質結合部位を形成している残基の立体構造が少し変化し、基質結合ポケットが狭くなったため、基質に対する親和性が低下したものと考えられる。

本研究ではプロトロンビン Himi について、今までの異常プロトロンビンに関する報告をもとにして酵素学的性質の検討を行い、さらに世界で初めてプロトロンビン異常症の遺伝子解析を行った。

発端者の血漿中のプロトロンビン活性は、一段法もしくは *Echis carinatus* 蛇毒法で約 10%、両親はそれぞれ約 50% であったが、抗原量は全員正常値を示した。このことより本家系は先天性の異常プロトロンビン血症であると診断され、発端者はホモ接合体かあるいは、両親が血族婚でないので2つの異なる異常プロトロンビンを有する二重ヘテロ接合体であると考えられた。発端者の血漿から精製した異常プロトロンビンを用いると、Xa 因子による活性化様式は正常であり、Xa 因子による切断部位は正常であると考えられた。しかし、生成した α -トロンビンのフィブリノゲン凝固活性は約 37% と低下しており、一方合成ペプチド基質に対する水解能は正常と同じであった。以上の結果から、プロトロンビン Himi は α -トロンビン領域内に異常が存在すると予想された。そこで本研究では、患者染色体 DNA を用いてトロンビン領域の遺伝子解析を行い、Met-337 が Thr (変異 I) に、Arg-388 が His (変異 II) に置換していることを明らかにした。さらに両親の染色体 DNA を調べることによって、変異 I は父由来、変異 II は母由来であることを明らかにした。従って、発端者の血漿中には2種類の異なる異常プロトロンビンが存在する二重ヘテロ接合体であると考えられた。

プロトロンビン Himi の変異 II の部位である Arg-388 (α -ト

ロンビン B 鎖上68番目) はキモトリプシン番号では73番目に相当し、またキモトリプシン番号では59~101番の領域は各種セリンプロテアーゼの間でホモロジーが低い。これはプロトロンビンでは365~418残基に相当し、この領域は糖が結合している他、 α -トロンビンから β -トロンビンに変換する際に切断される Arg-392-Arg-393 結合が存在する。この β -トロンビンは合成基質を分解するもののフィブリノゲンをフィブリンに変換しない。これらのことより、プロトロンビンの365~418残基に相当する領域は基質結合部位といわれている。さらに、Bode ら³⁸⁾ による α -トロンビンの立体構造モデルを用いると、Arg-388 はアニオン結合部位に位置していると考えられる。アニオン結合部位は陽性に荷電している活性中心近傍の表面残基であり、多くの基質や補因子、インヒビターなどとの結合に関与する部位であると考えられ³⁹⁾⁴⁰⁾、フィブリノゲン、トロンボモジュリン、ヒルジンはこの部位に競合的に結合する⁴¹⁾⁴²⁾。最近 Wu ら⁴³⁾ は、一アミノ酸を置換したリコンビナント変異トロンビンを何種類か合成し、フィブリノゲンあるいはトロンボモジュリンの結合部位について検討した。その研究によると、 α -トロンビン B 鎖上の Arg-68 \rightarrow グルタミンに置換したリコンビナント変異トロンビンは、リコンビナント正常トロンビンと比較すると、フィブリノゲン凝固能は著明に低下するが、合成基質水解能は正常であった。精製プロトロンビン Himi も同様の酵素学的性質を示した。さらにこのリコンビナント変異トロンビンは、プロテイン C 活性化能の低下も示し、それはトロンボモジュリン結合能の低下により生じるものであった。以上の結果から α -トロンビン B 鎖上68番目、つまりプロトロンビン上 Arg-388 は、フィブリノゲンおよびトロンボモジュリン両方の重複した結合部位であると考えられ、この残基の異常によりトロンビンの凝固促進作用と凝固阻止作用の両方が低下するものと思われる。理論的には臨床上、フィブリノゲン (あるいはその他の凝固因子) のみとの結合部位の異常であれば出血傾向に、トロンボモジュリンのみとの結合部位の異常であれば血栓傾向になることが予想される。プロトロンビン Himi の変異 II は、まさに両者の結合部位が重複した部位の異常で、出血傾向と血栓傾向とが相殺されてしまう可能性がある。本症は臨床的に無症状で出血傾向を全く示さなかったため、この試験管内反応系での実験結果を臨床的に裏付けているかもしれない。

一方、変異 I の部位である Met-337 (α -トロンビン B 鎖上17番) の機能に関しては、現在まだ報告がなく解明されていない。しかし、変異 I のヘテロ接合体である父のプロトロンビン活性が50%に低下していることより、Met-337 はフィブリノゲンをフィブリンに変換するのに重要な残基であることが予想される。また、 α -トロンビンの立体構造をコンピューターグラフィックを用いて表現すると、Met-337 の残基について以下の点は正しいと思われる (国立循環器病センター研究所、宮田敏行博士による解析)。即ち、Met-337 は活性中心から離れているので、この置換は活性部位の立体構造には影響を与えない。Met-337 の立鎖は、アニオン結合部位の一部である Arg-382 (トロンビン Quick I において Arg-382 \rightarrow Cys の置換が報告されている部位) の近くに位置しており、この残基の置換はアニオン結合部位の立体構造を変化させ、基質結合に影響を与える可能性がある。今後、この残基のリコンビナント変異トロンビンを作成し、その活性についての検討が必要であろう。

以上、本研究の結果と立体構造モデルからの理論的な推察を

合わせて考えてみると、トロンビン分子上の Met-337 と Arg-388 は、フィブリノゲンがフィブリンに変換する際に重要な残基であると考えられた。また Arg-388 はトロンボモジュリンとの結合部位でトロンビンの凝固阻止活性の発現に重要であると考えられ、本症例ではこの残基の変異を持っていることより、プロトロンビン活性が低値であるにもかかわらず、出血症状を認めなかった可能性が考えられた。

なお本研究では、最近癌遺伝子や癌抑制遺伝子の突然変異検出法として用いられるようになっている SSCP 分析法を、変異部位の検出に応用した。この方法を用いることにより、一塩基置換の部位を簡便、迅速に検出でき、しかも多数試料の分析を効率よく行うことが可能であった。今後、各種遺伝病の原因遺伝子の構造異常を検出する方法としても広く応用することが期待できると思われる。

結 論

異常プロトロンビン (プロトロンビン Himi) の生化学、分子生物学的解析を用いて、トロンビン活性発現に関与するアミノ酸残基について検討し、以上の結論を得た。

1. 発端者の精製異常プロトロンビンを活性化して得られた α -トロンビンのフィブリノゲン凝固活性は低下していたが、合成ペプチド基質に対する水分解能は正常と同じであった。以上の結果から、プロトロンビン Himi は α -トロンビン領域の基質結合部位に異常が存在すると予測された。

2. 患者染色体 DNA を用いてトロンビン領域の塩基配列を決定したところ、発端者は 2 種類の異常プロトロンビンを有する二重ヘテロ接合体であり、一つは Met-337 の Thr への置換 (変異 I)、もう一つは Arg-388 の His への (変異 II) 置換が認められた。両親の染色体 DNA 解析の結果、変異 I は父由来、変異 II は母由来であることが明らかになった。

3. 以上より、Met-337 と Arg-388 は、トロンビン分子上におけるフィブリノゲンをフィブリンに変換する際に重要な残基であると考えられた。

4. Arg-388 はトロンボモジュリンと結合し、凝固阻止活性の発現に重要であるとの試験管内反応系の実験結果があるが、この残基の異常を持つ本症例が、異常プロトロンビンでありながら出血症状を認めなかったことは、その実験を臨床的に裏付けている可能性が考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始研究の御指導と御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり御指導頂いた金沢大学遺伝子実験施設山口和男教授、および国立循環器病センター研究所脈管生理部血栓研究室室長宮田敏行博士に感謝いたします。さらに、スタフィロコグラゼを供与下さいました九州大学理学部生体高分子学講座岩永貞昭教授、および貴重な患者血漿を御提供頂きました水見市民病院内科峰谷春雄先生に厚く御礼申し上げます。

また、研究に御協力頂きました金沢大学医学部第三内科凝固グループをはじめ教室員の各位、並びに金沢大学医学部検査部血液検査室の皆様へに深謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は、第52回日本血液学会 (1990年)、第13回日本血栓止血学会 (1990年)、第54回日本血液学会 (1992年) において発表した。

文 献

- Butkowski, R. J., Elion, J., Downing, M. R. & Mann, K. G.: Primary structure of human prothrombin 2 and α -thrombin. *J. Biol. Chem.*, 252, 4942-4957 (1977).
- Thompson, A. R., Enfield, D. L., Ericsson, L. H., Legaz, M. E. & Fenton, J. W. II: Human thrombin: Partial primary structure. *Arch. Biochem. Biophys.*, 178, 356-367 (1977).
- Walz, D. A., Hewett-Emmett, D. & Seegers, W. H.: Amino acid sequence of human prothrombin fragment 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1969-1972 (1977).
- Degan, S. J. F., MacGillivray, R. T. A. & Davie, E. W.: Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin. *Biochemistry*, 22, 2087-2097 (1983).
- Clauss, A.: Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta. Haematol.*, 17, 237-246 (1957).
- 藤巻道男: 抗凝固療法のモニタリング. *臨床病理*, 70 (臨時増刊), 273-281 (1987).
- 橋本仙一郎: トロンビン時間法によるフィブリノゲンの定量. *臨床病理*, 21, 615-620 (1973).
- Morita, T. & Iwanaga, S.: Prothrombin activator from *Echis carinatus* venom. *Methods Enzymol.*, 80, 303-311 (1981).
- Morita, T., Igarashi, H. & Iwanaga, S.: Staphylocoagulase. *Methods Enzymol.*, 80, 311-319 (1981).
- Soulier, J. P. & Prou-Wartelle, O.: Etude comparative des taux de cofacteur de la staphylocoagulase (CRF) et des taux de facteur II (prothrombine) dans diverses conditions. *Nouv. Rev. Fr. Hemat.*, 6, 623-636 (1966).
- Morita, T., Iwanaga, S. & Suzuki, T.: The mechanism of activation of bovine prothrombin by an activator isolated from *Echis carinatus* venom and characterization of the new active intermediates. *J. Biochem.*, 79, 1089-1108 (1976).
- Laurell, C. B.: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, 15, 45-52 (1966).
- Ouchterlony, O.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In D. M. Weir (ed.), *Handbook of Experimental Immunology*, 1st ed., p655-706. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1967.
- Laurell, C. B.: Antigen antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 10, 358-361 (1965).
- Morrison, S. A. & Esnouf, M. P.: The nature of thrombin during dicoumarol therapy. *Nature New Biol.*, 242, 92-94 (1973).
- Kawabata, S., Morita, T., Iwanaga, S. & Igarashi, H.: Difference in enzymatic properties between α -thrombin-staphylocoagulase complex and free α -thrombin. *J. Biochem.*, 97, 1073-1078 (1985).
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- Kunkel, L. M., Smith, K. D., Boyer, S. H.,

- Borgaonkar, D. S., Wachtel, S. S., Miller, O. J., Berg, W. R., Jones, H. W. & Rary, J. M.: Analysis of human Y chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1245-1249 (1977).
- 19) Degan, S. J. F. & Davie, E.: Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*, **26**, 6165-6177 (1987).
- 20) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988).
- 21) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya, T.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-2770 (1989).
- 22) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**, 874-879 (1989).
- 23) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 24) Inomoto, T., Shirakami, A., Kawauchi, S., Shigekiyo, T., Saito, S., Miyoshi, K., Morita, T. & Iwanaga, S.: Prothrombin Tokushima: Characterization of dysfunctional thrombin derived from a variant of human prothrombin. *Blood*, **69**, 565-569, (1987).
- 25) 村越敏雄, 西田雅喜: Dysprothrombin "Obihiro": 2 症例の検討. *日血会誌*, **47**, 630 (1984).
- 26) Bezeaud, A., Drouet, L., Soria, C. & Guillin, M. C.: Prothrombin Salakta: An abnormal prothrombin characterized by a defect in the active site of thrombin. *Thromb. Res.*, **34**, 507-518 (1984).
- 27) Rabiet, M. J., Jandrot-Perrus, M., Bossel, J. P., Elion, J. & Josso, F.: Thrombin Metz: Characterization of the dysfunctional thrombin derived from a variant of human prothrombin. *Blood*, **63**, 927-934 (1984).
- 28) Girolami, A., Coccheri, S., Palareti, G., Poggi, M., Burul, A. & Cappellati, G.: Prothrombin Molise: A "new" congenital dysprothrombinemia, double heterozygosis with an abnormal prothrombin and "true" prothrombin deficiency. *Blood*, **52**, 115-125 (1978).
- 29) Robiet, M. J., Furie, B. C. & Furie, B.: Molecular defect of prothrombin Barcelona: Substitution of cysteine for arginine at residue 273. *J. Biol. Chem.*, **261**, 15045-15048 (1986).
- 30) Diuguid, D. L., Rabiet, M. J., Furie, B. C. & Furie, B.: Molecular defects of factor IX Chicago-2 (Arg-145→His) and prothrombin Madrid (Arg 271→Cys): Arginine mutations that preclude zymogen activation. *Blood*, **74**, 193-200 (1989).
- 31) Huisse, M. G., Dreyfus, M. & Guillin, M. C.: Prothrombin Clamart: Prothrombin variant with defective Arg-322—Ile cleavage by factor Xa. *Thromb. Res.*, **34**, 507-518 (1984).
- 32) Shapiro, S. S., Fradera, M. J. & McCord, S.: Prothrombin San Juan: A complex new dysprothrombinemia. *J. Clin. Invest.*, **53**, 73a (1974).
- 33) Miyata, T., Morita, T., Inomoto, T., Kawauchi, A., Shirakami, A. & Iwanaga, S.: Prothrombin Tokushima, a replacement arginine-418 by tryptophan that impairs the fibrinogen clotting activity of derived thrombin Tokushima. *Biochemistry*, **26**, 1117-1122 (1987).
- 34) Henriksen, R. A. & Owen, W. G.: Characterization of the catalytic defect in the dysphthrombin, thrombin Quick. *J. Biol. Chem.*, **262**, 4664-4669 (1987).
- 35) Henriksen, R. A. & Mann, K. G.: Identification of the primary structural defect in the dysphthrombin thrombin Quick I: Substitution of cysteine for arginine-382. *Biochemistry*, **27**, 9160-9165 (1988).
- 36) Henriksen, R. A. & Mann, K. G.: Substitution of valine for glycine-558 in the congenital dysphthrombin thrombin Quick II alters primary substrate specificity. *Biochemistry*, **28**, 2078-2082 (1989).
- 37) Miyata, T., Aruga, R., Umeyama, H., Bezeaud, A., Guillin, M-C. & Iwanaga, S.: Prothrombin Salakta: Substitution of glutamic acid-466 by alanine reduces the fibrinogen clotting activity and the esterase activity. *Biochemistry*, **31**, 7457-7462 (1992).
- 38) Bode, W., Mayr, I., Baumann, U., Huber, R., Stone, S. R. & Hofsteenge, J.: The refined 1.9 Å crystal structure of human α -thrombin: Interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Try-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO. J.*, **8**, 3467-3475 (1989).
- 39) Fenton, J. W. II: Thrombin specificity. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **370**, 468-495 (1981).
- 40) Berliner, L. J., Sugawara, Y., Fenton, J. W. II: Human α -thrombin binding to polymerized fibrin-sepharose: Evidence for an anionic binding region. *Biochemistry*, **24**, 7005-7009 (1985).
- 41) Maraganore, J. M., Chao, B., Joseph, M. L., Jablonski, J. & Ramachandran, M. L.: Anticoagulant activity of synthetic hirudin peptides. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8692-8698 (1989).
- 42) Tsiang, M., Lentz, S. R., Dittman, W. A., Wen, D., Scarpati, E. M. & Sadler, J. E.: Equilibrium binding of thrombin to recombinant human thrombomodulin: Effect of hirudin, fibrinogen, factor Va, and peptide analogues. *Biochemistry*, **29**, 10602-10612 (1990).
- 43) Wu, Q., Sheehan, J. P., Tsiang, M., Lentz, S. R., Birktoft, J. J. & Sadler, J. E.: Single amino acid substitutions dissociate fibrinogen-clotting and thrombomodulin-binding activities of human thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6775-6779 (1991).

Key words prothrombin, thrombin, dysprothrombinemia, fibrinogen, thrombomodulin

Human prothrombin is the zymogen of the serin protease thrombin. Biochemical and molecular analysis of abnormal prothrombin molecules, prothrombin Himi, have been performed to elucidate amino acid residues essential for the expression of thrombin activity. Prothrombin activity of the proband's plasma was 10% that of the normal, whereas prothrombin antigen was normal. There was no history of excessive bleeding. The prothrombin Himi purified from the proband's plasma exhibited the following properties. 1) Factor Xa-catalyzed proteolysis of prothrombin Himi was normal. 2) Alpha-thrombin derived from prothrombin Himi showed reduced fibrinogen clotting activity, although it retained full hydrolytic activity toward synthetic substrates. These results strongly suggest that the abnormality in this enzyme resides at the substrate binding site and not in the active site of the molecule. To elucidate the structural abnormality of the variant prothrombin, we performed molecular analysis of dysprothrombin. Polymerase chain reaction amplification of the exons 8 through 14 of the proband and her family members' prothrombin genes, which code the α -thrombin moiety, followed by single-strand conformation polymorphism analysis, identified two variant conformers in exon 10 specific to this family. One variant allele detected in the father was inherited by the proband, and the other detected in the mother was also inherited. Sequencing showed two novel point mutations in the proband's gene. One is a T to C transition, resulting in the substitution of threonine for methionine at codon 337 (mutation I). The other is a G to A transition, resulting in the substitution of histidine for arginine at codon 388 (mutation II). By sequencing analysis of her parents' genes, it was determined that mutation I was inherited from the father and mutation II from the mother. These results confirm that prothrombin Himi is compound heterozygous for two dysfunctional prothrombin molecules. This present study suggests that Arg-388 and Met-337 in α -thrombin are critical residues in determining the specificity of thrombin toward fibrinogen.